

論文内容の要旨

論文題目

Polypyrimidine Tract-binding Protein Regulates Cell Cycle Through IRES-dependent Translation of CDK11^{p58} in Mouse ES cells.

(PTB による CDK11^{p58} の IRES 依存的翻訳を介したマウス ES 細胞の細胞周期制御)

氏名 大野 里奈

【Summary】

本研究では、マウス胚性幹 (ES) 細胞において polypyrimidine tract-binding protein (PTB) が CDK11^{p58} の internal ribosome entry site (IRES) 依存的翻訳を直接抑制することにより、M 期の進行を制御していることを、増殖能が低下する *ptb* 欠損 (*ptb*^{-/-}) ES 細胞を用いて PTB の機能を解析し、明らかにした。今まで分化細胞において PTB が up-stream of N-ras (UNR) という因子を介して CDK11^{p58} の発現を抑制しているということが知られていたが、ES 細胞においては UNR を介さず、PTB が直接 CDK11^{p58} の IRES 活性を抑制していることが本研究で示された。PTB による直接的な CDK11^{p58} の制御は、ES 細胞特有の制御機構であると考えられる。

【Introduction】

ES 細胞は、胚盤胞の内部細胞塊より樹立される、多分化能と自己複製能を持つ細胞である。その多分化能と高い増殖能により、再生医療への応用が期待されている。近年では、体細胞に特定の因子を発現させることで、ES 細胞様の多分化能をもつ induced pluripotent stem (iPS) 細胞を作り出す技術が開発され、再生医療への応用に対する期待が一段と高まっている。ES 細胞、iPS 細胞を再生医療に用いる際にはそれぞれいくつかの問題が存在するが、どちらの細胞もその高い増殖能により生体内でがん化するという危険性が、共通の問題点として挙げられる。細胞の倍化時間は、例えば mouse embryonic fibroblast が約 20 時間であるのに対して、ES 細胞は 8-10 時間と短い。また、これらの多能性細胞はがん細胞に類似した性質を有し、生体内に移植した細胞の分化と増殖を制御しないと、がん化してしまうのである。しかし、この高い増殖能の制御機構には未だ不明な点が多く、ES 細胞の高い増殖能がどのような機構で維持されているのかを明らかにすることは再生医療への応用を考える上でも重要な課題となっている。

ES 細胞の高い増殖能の原因はその特徴的な細胞周期制御にあると考えられており、その特徴に関する解析がさかんに行われてきた。ES 細胞では G1 期が短く、多くの細胞が S 期にあり、チェックポイントがほとんど機能していないという特有の細胞周期をもつことが分かっている。このよ

うな細胞周期の制御機構を解明するため、細胞周期調節因子の発現などが調べられており、例えば Rb が細胞周期を通し常に高リン酸化状態にあるということや、分化細胞では発現に周期性を持ち、細胞周期の調節に重要であるサイクリンやサイクリン依存的キナーゼなどが、常に高発現していることがわかってきている。しかし、なぜこのような状態で ES 細胞の細胞周期が正常に維持されるのか、なぜサイクリンなどの変動が起らないのかといった疑問は未だ解明されておらず、ES 細胞の持つ高い分化能との関連性や、生体内に移植した際にがん化を抑制する方法に関する理解が望まれている。

そこで、本研究では当研究室で作成した、増殖能の顕著な低下を示す *ptb*^{-/-} ES 細胞を用いて、この ES 細胞の増殖能低下の原因及び ES 細胞の細胞周期の解析を試みた。PTB は hnRNP family member であり、ピリミジンに富む配列に結合する因子として 1991 年に同定され、生体内では多くの組織で発現していることが知られている。PTB は 4 つの RNA 認識モチーフと 1 つの核局在・核移行シグナルを持つ、約 56 kDa のタンパクである。PTB は主に mRNA の制御に関与しており、知られている機能としては internal ribosome entry site (IRES) 依存的翻訳、選択的スプライシング、ポリ A 付加、mRNA の安定性や局在の制御などが挙げられ、多機能な因子として知られている。近年、がん細胞において PTB の発現が上昇しており、その発現をノックダウンすると腫瘍細胞などにおいて増殖が抑制されるという報告があり、がん化や細胞増殖との関係性が強く示唆されている。しかし、PTB がどのように細胞増殖制御に関わるのかについては、今のところまったくわかっていない。

当研究室では *ptb* ノックアウトマウスを作成してその表現型解析を行ってきた。その結果 *ptb* ノックアウトマウスは着床前後の時期 (胎生 4-6 日) に致死であることがわかった。*ptb* ノックアウトマウスの胚盤胞において内部細胞塊マーカー (Oct-3/4, Nanog and Rex-1) の発現を調べたところ、野生型マウスと同様の発現が確認されたことから、*ptb* ヘテロマウスを交配して得られた胚盤胞から ES 細胞株の樹立を試みたが、*ptb*^{-/-} ES 細胞を得ることはできなかった。そこで、Cre-loxP システムを用い、相同組み換えにより 2 クローンの *ptb*^{-/-} ES 細胞を樹立した。*ptb*^{-/-} ES 細胞はフィーダー細胞上で ES 細胞特有のコロニーを形成したが、野生型と比べてコロニーが小さく、増殖の顕著な低下が認められた。これらの結果から、PTB がマウスの胚発生初期において重要な役割を持つということ、さらに ES 細胞での増殖に関与していることが明らかとなった。

ptb^{-/-} ES 細胞にみられる顕著な増殖能低下の原因を突き止めるため、本研究では PTB の機能の一つである IRES 依存的翻訳制御と ES 細胞の細胞周期の関係性に着目した。IRES は cap 非依存的にリボソームをリクルートする mRNA の上の構造で、1988 年にウイルスの RNA において見い出された。その後、2001 年に IRES 構造を持つ細胞内の mRNA が発見され、アポトーシス、低酸素状態、M 期などに発現する幾つかの因子が IRES 依存的翻訳制御を受けていることが次々と報告されている。M 期においては、eIF4E の機能が抑制されることにより cap 依存的翻訳が低下し、IRES 依存的翻訳へのシフトが起こることが知られている。ES 細胞での IRES 依存的翻訳制御の重要性についてはほとんど知られていないが、PTB を欠損させると増殖能が低下することから、ES 細胞の細胞周期制御における IRES 依存的翻訳制御の異常が増殖能の低下につながっているのではないかと考えて研究を進めた。

【Result】

野生型と *ptb*^{-/-} ES 細胞の増殖を WST-1 assay により調べたところ、*ptb*^{-/-} ES 細胞は野生型に比べて増殖が遅いことが確かめられた。また、培養中の生細胞の割合は野生型と差がないことなどから、*ptb*^{-/-} ES 細胞の増殖が遅いのは、細胞死などが起きているためではないことを確認した。

PTB は多機能な因子であるが、その機能は大きく核内でのものと細胞質でのものとに分けられる。PTB の核内での機能としては選択的スプライシング、ポリ A 付加などがあり、細胞質では IRES 依存的翻訳、mRNA の安定性や局在の制御などが挙げられる。これらの PTB のどの機能が ES 細胞の増殖に影響しているのかを推測するため、PTB の細胞内局在に着目した。PTB は通常核に局在するが、16 番目のセリンがリン酸化されることにより、細胞質に移行するということが知られ

ている。そこで、16番目のセリンをアラニンまたはアスパラギン酸に置換して、リン酸化が起こらないものと、リン酸化を擬態した二つの変異体を作成し、それぞれを *ptb*^{-/-} ES 細胞に発現させて増殖の回復を調べた。その結果、どちらの変異体を発現させても増殖が回復することが分かった。このことから、PTB は核と細胞質の区別がなくなる、M 期において機能しているのではないかと考えた。

そこで、thymidine-nocodazole block により細胞を M 期前中期で同調培養し、フローサイトメトリーにより細胞内 DNA 量を測定することで細胞周期の進行を調べた。その結果、*ptb*^{-/-} ES 細胞は野生型と比べて G1 期ピークの出現が遅く、G1 期への移行が緩やかであり、M 期の進行・離脱が遅いということが明らかになった。

ptb^{-/-} ES 細胞の M 期の進行・離脱が遅い原因を突き止めるため、細胞周期調節因子としてよく知られている、サイクリンや p53 などの mRNA の安定性及びタンパクの発現量を調べたが、野生型と比べて顕著な違いは見られなかった。

そこで、DAPI による染色体の可視化を行ったところ、*ptb*^{-/-} ES 細胞において多核や染色体分配の増加が観察された。

これらの結果から M 期において染色体分配に関与する CDK11^{p58} という因子に着目した。

CDK11 は CDK11^{p110} と CDK11^{p58} の二つのアイソフォームを持ち、CDK11^{p110} は cap 依存的に翻訳され、スプライシングなどに関与するということが知られている。CDK11^{p58} は p110 の mRNA にある IRES から p110 と同じ読み枠で翻訳され、M 期の進行・離脱に関与するキナーゼであるという報告がある。CDK11^{p58} が IRES 依存的翻訳制御を受けるといふことと、M 期の進行・離脱に関与する因子であるといふことから、*ptb*^{-/-} ES 細胞の M 期の進行・離脱の遅れの原因は CDK11^{p58} の発現異常にあるのではないかと考えた。実際に、M 期における CDK11^{p58} の発現量を調べてみると、野生型 ES 細胞においては M 期の進行に伴って発現が増加し、その後減少するという傾向にあるのに対し、*ptb*^{-/-} ES 細胞ではそのような変動が見られず、常に高発現している傾向にある事がわかった。さらに野生型 ES 細胞の M 期における PTB の発現は、CDK11^{p58} の発現パターンと逆相関して変動していることが明らかになった。これらの結果から、PTB が CDK11^{p58} の発現を抑制している可能性が示唆された。

次に、CDK11^{p58} の発現が変動する原因を調べるために、M 期における CDK11^{p58} の mRNA の発現をノザンブロッティングにより調べたが、野生型と *ptb*^{-/-} ES 細胞とでは発現パターンに差は見られなかった。CDK11^{p58} は IRES 依存的翻訳制御を受けるといふ報告があるので、*ptb*^{-/-} ES 細胞における CDK11^{p58} の IRES 活性をレポータージーンアッセイにより調べた。CDK11^{p58} の IRES は過去に報告のある、CDK11^{p58} の開始メチオニンから上流約 400b の領域を用いた。その結果、*ptb*^{-/-} ES 細胞では野生型に比べて CDK11^{p58} の IRES 活性が促進されており、また PTB の発現により CDK11^{p58} の IRES 活性が抑制されることが示された。このことから、PTB が IRES 依存的翻訳を介して CDK11^{p58} の発現を制御しているということが考えられた。

PTB による CDK11^{p58} の発現制御に関しては、2007 年に up-stream of N-ras (UNR) を介した抑制機構が報告されている。UNR は IRES 制御因子であり、CDK11^{p58} の IRES 活性を促進するが、UNR 自身の IRES 活性が PTB により抑制されており、PTB は UNR の発現制御を介して間接的に CDK11^{p58} の発現を抑制していると考えられている。そこで、ES 細胞で見られた CDK11^{p58} の変動が UNR を介した制御であるかどうかを検証するため、UNR の M 期における発現の変化を調べた。その結果、UNR のタンパク量は M 期において変動しないということが新たに分かった。この結果は M 期における CDK11^{p58} の発現量の変動は、UNR によるものではなく、PTB による直接の制御である可能性を示唆している。UNR の発現パターンに関しては、293T 細胞などでは M 期に発現が上昇するという報告があるが、ES 細胞ではそのような変動は見られなかった。また、非同調時あるいは M 期における UNR の発現量は、野生型と *ptb*^{-/-} ES 細胞において差は見られなかった。これらの結果から、UNR は ES 細胞において既に報告されている PTB による制御ではなく独自の制御を受けており、また UNR の機能自体も他の細胞とは異なると考えられる。

UNR の発現量を調べた結果、ES 細胞では PTB が直接 CDK11^{p58} の IRES 依存的翻訳を制御している可能性が示唆されたことから、PTB が CDK11^{p58} の IRES に直接結合するかどうかを、CDK11^{p58} の IRES を用いた RNA EMSA を用いて調べた。PTB は大腸菌で発現させたものを精製して用いた。その結果、PTB は CDK11^{p58} の IRES に直接結合することが明らかになった。

以上の結果から、ES 細胞では PTB が UNR を介さず直接 CDK11^{p58} の IRES に結合して CDK11^{p58} の発現を抑制し、M 期の正常な進行・離脱を制御していることが示された。

【Discussion】

本研究では、ES 細胞において PTB が M 期の進行・離脱に関与するキナーゼである CDK11^{p58} の IRES 依存的翻訳を直接抑制することにより、M 期の正常な進行を制御していることを明らかにした。また、本研究により ES 細胞特有の CDK11^{p58} の IRES 依存的翻訳制御機構が明らかになった。ES 細胞の細胞周期制御において、IRES 依存的翻訳の重要性に関しては今まで明らかにされていなかったが、ES 細胞においても M 期における IRES 依存的翻訳制御が起こることが分った。これは ES 細胞の M 期制御において IRES 依存的翻訳の制御が重要であることを示した初めての研究である。

CDK11^{p58} は M 期の進行・離脱に関与するキナーゼであるが、その詳しいターゲットについては分かっていない。しかし、M 期における CDK11^{p58} の過剰発現は中心体の過形成などを引き起こし、正常な染色体分配を抑制して、M 期の正常な進行を妨げることが知られている。本研究の結果から、*ptb*^{-/-} ES 細胞において染色体の異常な分配などが増加していることが明らかになった。このことから *ptb*^{-/-} ES 細胞の M 期の遅れは CDK11^{p58} の過剰発現による染色体の分配異常であることが示された。

分化した細胞では、PTB は UNR を介して CDK11^{p58} の IRES 活性を抑制しているが、ES 細胞では直接抑制していることが示された。こうした分化細胞との違いは、IRES の活性を制御する因子群の発現の違いが原因であるかもしれない。また、ES 細胞ではより速く細胞周期を進行させるために、より短い経路による素早いタンパク発現の制御が重要である可能性が考えられる。

ES 細胞においても IRES 依存的翻訳制御が起こっていることは新たな知見であった。分化細胞では M 期において cap 依存的翻訳から IRES 依存的翻訳制御へのシフトが起こるが、そのような変化が ES 細胞でも起こっていると考えられる。また、サイクリンなどの発現が変動しないことから、細胞周期でタンパク量を変動させる IRES 依存的翻訳制御が ES 細胞では分化細胞以上に重要になっている可能性があると考えている。

また、PTB の発現が M 期で変動していることは今まで報告されていない新しい知見である。ES 細胞では細胞周期中に発現量に変動がある因子はあまり知られていない。この PTB の急激な発現量の変動がどのように制御されているかを明らかにすることは、今後の課題である。変動するタンパクの制御機構を明らかにすることで、サイクリンなどが変動しない原因や理由を明らかにすることができるかもしれないと考えている。現在、PTB に見られる、タンパク量の変動はユビキチン・プロテアソーム系による分解制御かもしれないと推察している。サイクリンなどはプロテアソームによる分解制御を受けているが、ES 細胞でこれらのタンパクの発現量に変動していないことを考えるとユビキチン化のメカニズム、特に細胞周期に関与するユビキチンライゲースの働きが他の細胞とは異なり、このことによって ES 細胞特有の細胞周期が維持されているのではないかと考えている。